

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：34535

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670197

研究課題名(和文) 遺伝子組み換えツェツェバエの創出 アフリカトリパノソーマ症制圧を目指して

研究課題名(英文) A novel approach for gene-manipulation of tsetse fly

研究代表者

鈴木 高史 (Suzuki, Takashi)

神戸常盤大学・保健科学部・教授

研究者番号：70305530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000 円

研究成果の概要(和文)：アフリカトリパノソーマ症を媒介するツェツェバエの新たなコントロール法の構築を行うことを目的として、以下の解析を行った。ツェツェバエのコロニーを確立し麻酔システムの検討を行った。さらに *Glossina palpalis defensin* (GpDef) 分子の抗アフリカトリパノソーマ原虫活性プロファイルを明らかにした。当初予定していた、貯精嚢へのインジェクションは困難であったため、アフリカトリパノソーマ原虫の動き、エキソソーム関連分子解析、ツェツェバエゲノム上のポリドナウイルス類似配列を利用した代替遺伝子組換えシステムの構築検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Tsetse flies (*Glossina* spp.) transmit African trypanosomiasis. In order to effectively control the disease, development of a novel gene manipulating method is expected, which generates the tsetse fly refractory to African trypanosomes. For that purpose, *Glossina* insectary was firstly set up and preliminary anesthetic system of *Glossina* was established. Then, anti-microorganism activity of *Glossina palpalis defensin* (GpDef) was analyzed. The results showed that the molecule possessed a specific anti-trypanosomal activity. Initial idea of injecting DNA molecules into *G. palpalis* spermatheca was not successful. Thus in order to see the feasibility of establishing future gene modification system, the following analyses were carried out: a motility and exosome-related molecule of African trypanosome was analyzed and *Glossina* genome was surveyed in detail for polydnavirus.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ツェツェバエ ディフェンシン アフリカトリパノソーマ原虫

1．研究開始当初の背景

アフリカトリパノソーマ症は人獣共通感染症であり、アフリカの人々の健康、タンパク源としての家畜に甚大な被害を与えている。本疾患はアフリカトリパノソーマ原虫により引き起こされ、媒介昆虫のツェツェバエにより伝播される。本疾患に対してのコントロールは、主に殺虫剤によるツェツェバエの駆除により行われているが、その効果は極めて限定的である。一方、マラリアや他の寄生虫疾患を媒介するハマダラカなどの媒介昆虫に対しては、ショウジョウバエの遺伝子組み換え技術が応用され、その卵に外来遺伝子を導入することにより、当該寄生虫疾患を伝播しない昆虫が作製され、新たな寄生虫疾患コントロールツールが得られてきている。しかし、遺伝子組み換えツェツェバエ作製の試みは国内外で行われてきているが、成功例は皆無である。この主要な原因は、ツェツェバエが卵を産まず、卵が母体内で孵化し、蛹化寸前の幼虫まで発育した状態で出てくる、胎生である（卵に外来遺伝子を導入できない）ことにある。

2．研究の目的

ツェツェバエの新規遺伝子組換えシステムの構築を検討し、さらにツェツェバエのエフェクター分子としての *Glossina palpalis* defensin (GpDef) 分子の抗アフリカトリパノソーマ原虫活性を解析することにより、新たなアフリカトリパノソーマ症制圧につなげることを目的とした。

3．研究の方法

- 以下のような方法で解析を進めた。
- (1) ツェツェバエのコロニー作製と効果的な麻酔システムの探索
  - (2) GpDef 分子の抗微生物活性プロファイル解析
  - (3) 代替方法の探索

4．研究成果

- (1) ツェツェバエのコロニー作製と効果的な麻酔システムの探索

ツェツェバエ *Glossina palpalis* 種のコロニーを本研究用に確保し、メンブレンフィーディングにより吸血させるシステムを確立した。DNA のインジェクションを行うために氷上5分の麻酔では不十分であることが判明した。そこで、まずは十分な数が確保できるハマダラカ *Anopheles gambiae* を用いて *Drosophila* で麻酔に用いられる triethylamine (FlyNap (Carolina Biological Supply)) を用いて、その有効性を解析した。その結果、ハマダラカの羽化後

の日齢が FlyNap による麻酔効果に重要なことが明らかになった。羽化3日後のハマダラカは羽化5日後のものに比べて麻酔効果が表れるまでより時間がかかるが、短い時間で麻酔がされる傾向があることが明らかになった（表1、表2）。

Concentration of FlyNap	First revival	R (%) after 30 min	R (%) after 60 min	R (%) after 90 min	R (%) after 120 min
1 µl of stock	60min	0	10	80	90
2 µl of stock	85min	0	0	10	80
1/10 of stock	25min	10	40	100	100
1/100 of stock	No KD	No KD	No KD	No KD	No KD
1/1000 of stock	No KD	No KD	No KD	No KD	No KD
control (10µl of ethanol)	No KD	No KD	No KD	No KD	No KD

表1. FlyNapによる羽化3日後の *An. gambiae* に対する麻酔効果

各郡10匹ずつ3回の平均結果。First revival time:最初の *An. gambiae* が麻酔から覚めるまでに要した時間。No KD: 麻酔にかからなかった群。

Concentration of FlyNap	First revival	R (%) after 30 min	R (%) after 60 min	R (%) after 90 min	R (%) after 120 min
1 µl of stock	9min 14sec	40	40	40	40
2 µl of stock	1h 16sec	0	0	0	10
1/10 of stock	2min 30sec	60	100	100	100
1/100 of stock	9min 53sec	10	10	10	10
1/1000 of stock	No KD	No KD	No KD	No KD	No KD
control (10µl of ethanol)	No KD	No KD	No KD	No KD	No KD

表2. FlyNapによる羽化5日後の *An. gambiae* に対する麻酔効果

各郡10匹ずつ3回の平均結果。First revival time:最初の *An. gambiae* が麻酔から覚めるまでに要した時間。No KD: 麻酔にかからなかった群。

上記、*An. gambiae* の結果に基づき、FlyNap 5 µl を用いることで、同様に *G. palpalis* に対しても麻酔をかけることができる予備的な解析データが得られた。しかし、FlyNap を用いるには *An. gambiae* の結果から、羽化後の日数が重要なファクターとなると推察されたが、解析に必要な十分量の *G. palpalis* を得られなかった。

その後、所属異動に伴い、ツェツェバエのインセクタリーへの頻繁なアクセスが困難になり、また日本国内においてツェツェバエを輸入して解析することが困難であった。このため、実際のインジェクションまで進めることができなかった。

- (2) GpDef 分子の抗微生物活性プロファ

## イル解析

アフリカトリパノソーマ症の制圧を目標として、遺伝子組換えを目指すうえで、抗アフリカトリパノソーマ原虫活性を有するエフェクター分子の同定が重要となる。そこでツェツェバエの抗菌ペプチド defensin 分子 (GpDef) に着目しマラリア原虫、アフリカトリパノソーマ原虫、大腸菌、黄色ブドウ球菌に対してのエフェクター作用の解析を以下のように行った。

・ GpDef をハマダラカの中腸で発現させて、マラリア原虫を感染させることにより、抗マラリア原虫活性プロファイル解析した。

・ GpDef ペプチドを合成し、*in vitro* 培養アフリカトリパノソーマ原虫 (ツェツェバエ感染型)、*in vitro* 培養大腸菌・黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制活性測定を行った。

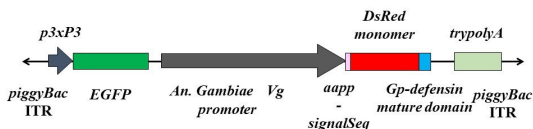


図 1. pBac-pvitellogenin-DsRed-GpDef の模式図

GpDef を DsRed monomer と融合した形で *An. gambiae* の vitellogenin promoter の制御下で発現するように構築した。

・ DsRed-GpDef 融合タンパク質発現ハマダラカ作製とその抗マラリア原虫活性解析

ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の 728 胚に pBac-pvitellogenin-DsRed-GpDef (図 1) のインジェクションを行い、EGFP 蛍光でスクリーニングを行い、2 系統を得た。このうち、発現が安定している 1 系統を用いて、以下の解析を行った。

DsRed-GpDef 発現蚊 (TG) とコントロール蚊 (WT) を吸血させ、48 時間後に DsRed シグナルを TG 蚊で確認した (図 2)。またリアルタイム PCR により、DsRed-GpDef 発現蚊で吸血に伴い GpDef 分子が発現することを確認した。

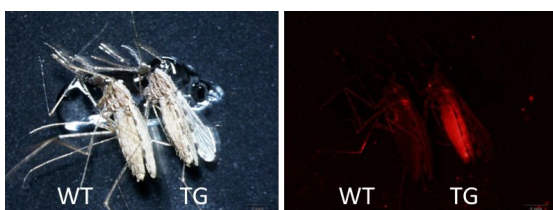


図 2. pBac-pvitellogenin-DsRed-GpDef 導入 *An. stephensi* の蛍光顕微鏡観察

吸血 2 日後の WT (非組換え蚊) と TG (遺伝子組換え蚊) の蛍光画像。TG では腹部で DsRed の発現が観察された。

DsRed-GpDef 発現蚊 (TG) とコントロール蚊 (WT) にマラリア原虫を感染させ、oocyst と sporozoite の数を比較した。その結果、oocyst 数では減少が見られたが、sporozoite 数では有意な差が見られなかった (表 3)。

No. of spz/SG	No. of mosquitoes	
	WT	TG
spz=0	4	4
1≤spz<50	0	0
50≤spz<500	3	5
500≤spz<5000	6	4
5000≤spz	2	2
% infected mosquitoes	73	73

表 3. WT と TG での sporozoite 数の比較  
n = 15, spz: sporozoite; SG: salivary gland

・ GpDef ペプチドの培養系での抗アフリカトリパノソーマ原虫活性、抗菌活性解析

GpDef ペプチドは (推定マチュア部位、推定活性部位いずれも) 培養アフリカトリパノソーマ原虫 (ツェツェバエ感染型) に対して、500 μM 以上の濃度で増殖を抑制した。

大腸菌、黄色ブドウ球菌に対しては、推定マチュア分子、推定活性部位いずれも 2mM でも増殖阻害はかからなかった。

ツェツェバエの体内には Wolbachia のような共生細菌が存在していることが知られている。このため、GpDef が大腸菌や黄色ブドウ球菌などのバクテリアに対して抗菌スペクトルを示さなかったものと考えられる。またマラリア原虫の oocyst 数では減少が見られたが sporozoite 数の減少が見られなかったことから、マラリア原虫に対しては大きな増殖阻害効果は無く、GpDef はアフリカトリパノソーマ原虫特異的に増殖を抑制すると推定された。このことから GpDef 分子は抗アフリカトリパノソーマ原虫活性を有するエフェクター分子として、将来的な遺伝子組換え (発現量を増やすなど) によりアフリカトリパノソーマ症制圧を目指す際に有効であると考えられた。

## (3) 代替方法の探索

当初の計画どおりの進展が難しかったため、代替手段でツェツェバエの遺伝子組換えを行うシステムの検討を行った。

まずは寄生生物であるアフリカトリパノソーマ原虫自体を遺伝子導入ツールに用いることができないか検討を試みた。アフリカトリパノソーマ原虫を遺伝子導入に用いるには、動きを制御する必要があると考えられた。この観点から動き関連分子 TbUNC119BP (Tb927.7.5300) の一部分の強制発現で原虫細胞の動きを制御することができると、またアフリカトリパノソーマ原虫のエクソソ

ームに含まれる分子群と相互作用することを明らかにした。従って、TbUNC119BP を制御して、エクソソーム中に組換えを行いたい遺伝子を導入できれば、ツェツェバエの遺伝子組換えシステムの構築につながると考えられた。

ポリドナウイルスは、寄生バチのゲノムにコードされている。ウイルス粒子の複製は雌バチの卵巣と側輸卵管の間に位置するカリックス部細胞内でのみ進行し、その後ウイルス粒子は寄生の際に卵と共に宿主に注入される。ツェツェバエゲノムにポリドナウイルス配列相同の部位があることは報告されていた (International Glossina Genome Initiative, Science 344 380-386(2014))。しかし、その機能は不明のままである。Vectorbase の配列情報をもとに、ポリドナウイルス類似配列を検索したところ、パッケージングに必要な ATPase, protease, capsid などがそろっており (表 4) ツェツェバエ内でもウイルス粒子として機能している可能性が考えられた。ポリドナウイルスの寄生バチ以外のゲノム上での機能は抗ウイルス作用などが報告されている (Gasmi et al. PLoS Genetics (2015)) が、ウイルス粒子としてではない。このため、ウイルス粒子として働いている場合、そのシステムを利用したの遺伝子組換えの方法が構築できる可能性が考えられた。

Gene Identifier	similarity	parabug
GM OY000040-RA	ATPase	GM OY010046 GM OY009081 GM OY011252
GM OY000041-RA	protease capsid	GM OY000668 GM OY009082 他3
GM OY000042-RA	protease	GM OY000043 他17
GM OY000043-RA	protease capsid	GM OY000042 他17
GM OY001867-RA	DNA polymerase	他39
GM OY011253-RA	integrase	GM OY011251

表 4. *Glossina* ゲノム上のポリドナウイルス類似配列

カラーでハイライトしたものは近接している配列

本研究ではツェツェバエを解析対象として、麻酔システムの検討、抗アフリカトリパノソーマ活性を有するエフェクター分子としての GpDef 分子のプロファイル解析を行った。当初予定していた、貯精嚢へのインジェクションは困難であったため、アフリカトリパノソーマ原虫の動き関連分子解析、ポリドナウイルス様配列の解析を行った。今後、これらの解析を引き続けて進めることにより、遺伝子組換えツェツェバエの創出につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. The Role of Detoxification Enzymes in the

Adaptation of the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae* (Giles; Diptera: Culicidae) to Polluted Water. King SA, Onayifeke B, Akorli J, Sibomana I, Chabi J, Manful-Gwira T, Dadzie S, Suzuki T, Wilson MD, Boakye DA, de Souza DK. Journal of medical entomology 54(6) 1674-1683 (2017). doi: 10.1093/jme/tjx164 査読有

2. Indication of Risk of Mother-to-Child *Toxoplasma gondii* Transmission in the Greater Accra Region of Ghana. Kwofie KD, Ghansah A, Osei JH, Frempong KK, Obed S, Frimpong EH, Boakye DA, Suzuki T, Ohta N, Ayi I. Maternal and child health journal 20(12) 2581-2588 (2016). doi: 10.1007/s10995-016-2084-z 査読有

3. Risk of transmission of viral haemorrhagic fevers and the insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Linnaeus) in some sites in Accra, Ghana. Suzuki T, Osei JH, Sasaki A, Adimazoya M, Appawu M, Boakye D, Ohta N, Dadzie S. Ghana medical journal 50(3) 136-141 (2016). PMC5044787 査読有

4. Clonal types of *Toxoplasma gondii* among immune compromised and immune competent individuals in Accra, Ghana. Ayi I, Kwofie KD, Blay EA, Osei JH, Frempong KK, Koku R, Ghansah A, Larrey M, Suzuki T, Boakye DA, Koram KA, Ohta N. Parasitology international 65(3) 238-244 (2016). doi: 10.1016/j.parint.2016.01.004 査読有

5. Discovery of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel from African *Aedes aegypti* Populations: Potential Phylogenetic Reasons for Gene Introgression. Kawada H, Higa Y, Futami K, Muranami Y, Kawashima E, Osei JH, Sakyi KY, Dadzie S, de Souza DK, Appawu M, Ohta N, Suzuki T, Minakawa N. PLoS neglected tropical diseases 10(6) e0004780 (2016). doi: 10.1371/journal.pntd.0004780 査読有

6. Effectiveness of SP-IPTp for Malaria and Evidence for the Need of *T. gondii* Infection Preventive Policy during Pregnancy in Ghana. Arthur-Mensah RJ, Blay AE, Ayi I, Larbi J, Suzuki T, Ohta N. Journal of Infectious Diseases and Epidemiology 2(3) 1-8 (2016). doi: 10.23937/2474-3658/1510018 査読有

7. Evaluating triethylamine in the anaesthesia of *Anopheles gambiae*. de Souza DK, Shafiu SA, Akorli J, Suzuki T. African Entomology 24(1) 236-240 (2016). doi:



8. *Toxoplasma gondii* infections among pregnant women, children and HIV-seropositive persons in Accra, Ghana. Ayi I, Sowah AO, Blay EA, Suzuki T, Ohta N, Ayeh-Kumi PF. Tropical medicine and health 44 17 (2016). doi: 10.1186/s41182-016-0018-5 査読有
9. Congenital toxoplasmosis and pregnancy malaria detection post-partum: Effective diagnosis and its implication for efficient management of congenital infection. Blay EA, Ghansah A, Otchere J, Koku R, Kwofie KD, Bimi L, Suzuki T, Ohta N, Ayi I. Parasitology international 64(6) 603-608 (2015). doi: 10.1016/j.parint.2015.08.004 査読有
10. Ovipositional Behavior of *Anopheles gambiae* Mosquitoes. Agyapong J, Chabi J, Ablorde A, Kartey WD, Osei JH, de Souza DK, Dadzie S, Boakye DA, Ohta N, Hadi MP, Suzuki T. Tropical medicine and health 42(4) 187-190 (2014). doi: 10.2149/tmh.2014-13 査読有
11. Joint Research Project on Infectious Diseases in West-African Subregion. Ido E, Suzuki T, Ampofo WK, Ayi I, Yamaoka S, Koram KA, Ohta N. Journal of Disaster Research 9(5) 813-817 (2014). dsstr000900050813 査読有

## 〔学会発表〕(計 4 件)

1. ガーナ共和国のネッタイシマカ個体群からアフリカ大陸初の電位依存性ナトリウムチャンネルのミューテーション (kdr) が発見された 川田 均, 邑並悠人, 比嘉由紀子, 鈴木高史, 皆川 昇 第 67 回日本衛生動物学会 2015 年 3 月 金沢大学
2. ツェツェバエ defensin 分子のハマダラカでの発現 和田良樹, 山本大介, 炭谷めぐみ, 松岡裕之, 太田伸生, 鈴木高史 第 67 回日本衛生動物学会 2015 年 3 月 金沢大学
3. 熱帯疾患コントロールへのアプローチ 鈴木高史 バイオナノシステムズ研究会 2016 年 1 月 九州大学
4. 神戸常盤大学におけるグローバル教育の現況 鈴木高史 第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2016 年 12 月 神戸常

## 6 . 研究組織

## (1)研究代表者

鈴木高史 (Suzuki Takashi)

神戸常盤大学・保健科学部・教授

研究者番号：70505530

## (2)研究協力者

Egyir-Yawson Alexander

Ghana Atomic Energy Commission, Accra, Ghana